

IAP9 Rec'd PCT/PTO 19 DEC 2009

1

UTILISATION THERAPEUTIQUE
DE LIPIDES EXTRAITS DE NACRE

5 La présente invention concerne l'utilisation de lipides extraits de nacre d'un mollusque nacrier en tant que médicament, notamment dans les pathologies et les traumatismes liés à une diminution de l'activité de la filaggrine et/ou une augmentation de l'activité de transglutaminase membranaire. Elle concerne également des compositions pharmaceutiques les contenant.

10

Le psoriasis est un désordre dermatologique inflammatoire chronique qui touche actuellement plus de 2 millions de personnes en France et 3 à 5 % de la population européenne. Avec près de 60 000 nouveaux cas chaque année en France, c'est une des affections dermatologiques les plus fréquentes. Bien que ses causes 15 restent encore imparfaitement connues, elle est considérée aujourd'hui comme une maladie auto-immune à facteurs génétiques et environnementaux.

Cette maladie se manifeste par des plaques rouges qui se recouvrent d'épaisses squames blanches. Elle peut toucher les coudes, les genoux, le bas du dos, le cuir chevelu, les pieds, les ongles ou les plis. Dans les cas les plus graves, le psoriasis 20 peut atteindre les oreilles ou le visage, voire le corps entier. La plupart du temps inoffensives, ces affections ont le désavantage d'être inesthétiques. Bien que la maladie ne soit pas contagieuse, les 3 % de la population affectés souffrent d'une foule de préjugés. Dans environ 8 % des cas, le psoriasis apparaît comme une maladie grave parce qu'il s'étend à tout le corps ou qu'il s'accompagne de graves 25 complications, en particulier rhumatismales.

Le psoriasis est caractérisé par (1) une hyperprolifération épidermique (croissance excessive avec différenciation incomplète et accélérée) et (2) une inflammation de l'épiderme et du derme visible localement. Aujourd'hui, il est avancé que cette maladie est causée et/ou développée par l'activation de lymphocytes T spécifiques

d'antigènes, des réactions autoimmunes, et une prolifération de facteurs médiateurs qui induiraient le prolifération des kératinocytes. Ainsi, la phase d'expression de la maladie est caractérisée par (1) une activation des lymphocytes T notamment due à l'interféron γ , (2) une activation des cellules épidermiques (les kératinocytes 5 secrètent des cytokines inflammatoires, telles que IL1, TNF α , et IL8, et des chimiokines), et (3) le recrutement des cellules endothéliales notamment celles du réseau capillaire veineux entraînant une vasodilatation et une interaction avec les globules blancs circulants. Les kératinocytes se divisent trop vite selon une séquence de kératinisation déréglée qui aboutit à une hyperprolifération des 10 couches épidermiques et à un épaississement de l'épiderme. Cela se traduit par une hyperkératose ou par un épaississement de la couche cornée qui devient sèche et desquamante.

Ainsi, compte tenu de ces mécanismes multiples, divers traitements sont aujourd'hui disponibles et couramment utilisés pour traiter les patients atteints de 15 psoriasis, incluant une variété de traitements par voie topique, par photothérapies, et par voie orale. Les traitements topiques incluent notamment les stéroïdes, le goudron, l'anthraline, la vitamine D3 et analogues, les rétinoïdes, et les rayonnements UV. Les effets secondaires associés à l'utilisation de traitement topique incluent l'épaississement de la peau, l'apparition de taches brunes, de 20 brûlures, d'irritation et de photosensibilité. L'utilisation de stéroïdes peut aussi conduire à une certaine résistance, rendant des traitements subséquents à base de stéroïdes inefficaces. La photothérapie englobe le traitement suivi médicalement aux rayonnements ultraviolets de type B (UV-B) ou le traitement au psoralène en combinaison avec des UV-A. L'usage à long terme de la photothérapie peut vieillir 25 prématièrement la peau et augmenter les risques de cancers de la peau. Les traitements par voie orale, généralement utilisés pour les cas les plus sérieux, comprennent l'administration de methotrexate, rétinoïdes oraux, ou de cyclosporine. L'utilisation de methotrexate demande un suivi médical important pour éviter tout dommage du foie. L'utilisation de rétinoïdes oraux doit être contrôlée chez les 30 femmes à cause de leurs effets tératogènes. La cyclosporine, un

immunosuppresseur, est réservée aux patients qui n'ont pas répondu à d'autres traitements par voie orale ou pour lesquels les autres traitements sont contre-indiqués. L'alternance de ces traitements, éventuellement en combinaison avec la photothérapie, a également été trouvée efficace dans certains cas.

5

Il n'existe donc pas à ce jour de traitement totalement satisfaisant et tous les patients ne répondent pas ou ne tolèrent pas les thérapies actuellement disponibles. De nouvelles alternatives de traitements du psoriasis sont donc recherchées, notamment pour en améliorer l'efficacité et/ou pour diminuer les effets 10 secondaires. Enfin, une meilleure utilisation des médicaments existants en association avec de nouveaux traitements pourrait déboucher sur des améliorations significatives.

La filaggrine est une protéine située dans les couches les plus superficielles de 15 l'épiderme. La profilaggrine, protéine riche en histidine, est le principal composant des grains de kératohyaline du stratum granulosum. Au cours de la différenciation terminale, la profilaggrine est déphosphorylée puis partiellement protéolysée en composés intermédiaires, puis en filaggrine. La filaggrine possède la capacité 20 d'agrérer les filaments de kératine en catalysant la formation des ponts disulfures entre les filaments de kératine. Elle entre dans la composition de l'enveloppe cornée. Elle joue un rôle dans l'hydratation puisqu'elle représente le réservoir essentiel des facteurs d'hydratation naturels (NMF). En effet, la filaggrine, après sa dégradation, est la source d'acides aminés qui seront métabolisés pour former des 25 composants des NMF, en particulier la glutamine est transformée en PCA (acide hydrolidone carboxylique) et l'histidine en acide urocanique. Ainsi, un taux bas en NMF caractérise des désordres cutanés importants, tels que le psoriasis (taux de NMF pratiquement nul), mais aussi l'ichtyose (taux de NMF pratiquement nul) et la dermatite atopique (taux de NMF bas par rapport à une peau normale). Le temps de renouvellement de l'épiderme d'un sujet atteint par le psoriasis est diminué (de 8 30 jours au lieu de 21 à 28 jours environ pour un épiderme normal). Un phénomène

tendant à éviter cette diminution du taux des facteurs d'hydratation naturels ou NMF (pour « natural moisturizing factors ») est alors observé, ce phénomène consistant en une accélération de l'hydrolyse de la filaggrine qui tend alors à s'épuiser.

5 En outre, le psoriasis est caractérisé par des altérations très spécifiques de certains marqueurs épidermiques, en particulier il est observé une augmentation de la production par les kératinocytes de la transglutaminase membranaire (ou transglutaminase 1) qui joue un rôle dans la formation de l'enveloppe cornée. Ainsi, jouer sur ce taux permettrait également d'améliorer l'état de la peau des sujets
10 atteints de ce désordre.

La polyarthrite rhumatoïde est également une maladie auto-immune à facteurs génétiques et environnementaux. Cette pathologie se manifeste par une inflammation articulaire source de douleurs et est souvent accompagnée de
15 déformation des articulations. Ainsi, dans de nombreux cas de polyarthrite, il y a atteinte auto-immune de la filaggrine. Les anticorps dits communément « antikératines » sont très spécifiquement associés à cette pathologie. Ils sont liés aux formes les plus sévères de la maladie et précèdent souvent l'apparition des signes cliniques. Ils sont synthétisés par des plasmocytes de la membrane
20 synoviale. Il a été montré que ces anticorps reconnaissent différentes formes moléculaires de la profilaggrine et de la filaggrine. Aujourd'hui, les auto-anticorps spécifiques dirigés contre la filaggrine épidermique (AFA pour Anti-Filaggrine Antibodies) sont considérés comme les plus importants et fiables marqueurs de la polyarthrite rhumatoïde.

25 Dans ce cadre, la demanderesse vient à présent de mettre en évidence des propriétés biologiques intéressantes de lipides extraits de nacre de mollusques, à savoir leur action sur la filaggrine et/ou la transglutaminase. En particulier, il a été mis en évidence que ces lipides extraits de nacre appliqués sur la peau induisent une surexpression de la filaggrine et une inhibition de l'expression de la
30

transglutaminase membranaire.

La présente invention vise donc une composition pharmaceutique comprenant des lipides extraits de nacre de mollusques nacriers dans un support pharmaceutiquement acceptable.

Elle a également pour objet les lipides extraits de nacre de mollusques nacriers à titre de médicament, notamment pour traiter des pathologies présentant une diminution de l'activité de la filaggrine et/ou une augmentation de l'activité de transglutaminase membranaire, plus spécifiquement pour traiter des pathologies liées à une diminution de l'activité cutanée de la filaggrine et/ou à une surexpression cutanée de la transglutaminase membranaire. En particulier, les lipides extraits de nacre de mollusques nacriers peuvent être utilisés pour traiter des pathologies cutanées, plus particulièrement choisies parmi le psoriasis, l'ichtyose et

la dermatite atopique, mais aussi des maladies auto-immunes liées à une atteinte auto-immune de la filaggrine, telles que notamment la polyarthrite rhumatoïde.

De façon tout à fait surprenante, il a été observé que la nacre des mollusques nacriers (mollusques capables de former de la nacre), en particulier des huîtres et

plus spécifiquement des huîtres du genre *Pinctada* et plus particulièrement du genre *Pinctada* espèce *margaritifera*, contenaient des lipides favorisant la régénération de la peau. En outre, aucune intolérance n'a été détectée lors de

application de ces lipides sur une peau humaine. De plus, comme spécifié ci-dessus, ces lipides extraits de nacre appliqués sur la peau induisent une surexpression de la filaggrine et une inhibition de l'expression de la transglutaminase membranaire.

Les lipides de nacre selon l'invention sont plus particulièrement obtenus par leur extraction à partir de mollusques nacriers définis ci-dessus. Le procédé d'extraction

comprend plus spécifiquement les étapes suivantes : 1) séparer la nacre du reste

de la coquille d'un mollusque nacrier, plus particulièrement de façon à n'obtenir que la couche aragonitique, 2) broyer la nacre pour obtenir une poudre, 3) effectuer une extraction lipidique à partir de cette poudre en soumettant celle-ci à au moins un solvant d'extraction ou un mélange de solvants, puis avantageusement 4) extraire
5 les lipides à partir du solvant ou du mélange de solvants utilisé. Avantageusement, la poudre obtenue en 2) présente une granulométrie moyenne (en nombre) inférieure à 20 µm, de préférence de l'ordre de 8 µm. La granulométrie est mesurée avec des moyens classiques à la portée de l'homme du métier, comme la technique de tamisage et/ou la technique à lecture Laser.

10

La séparation de la nacre du reste de la coquille peut être réalisée par tout moyen connu en soi et en particulier par meulage. Le broyage de la nacre peut notamment être réalisé en plusieurs étapes, notamment dans un premier temps par concassage, puis éventuellement par différentes techniques de broyage.

15

La nacre peut être avantageusement décontaminée, notamment par lavage(s) décontaminant(s), par exemple dans une solution d'hypochlorite de sodium, puis par séchage.

20

La nacre peut également être stérilisée, avantageusement après avoir été broyée, par toute méthode connue en soi. En particulier, la stérilisation est mise en œuvre par irradiation (irradiation aux rayons gamma) ou à chaud (chaleur sèche ou humide) (Atlan G., Delattre O., Berland S., Le Faou A., Nabias G., Cot D., Lopez E., Interface between bone and Nacre implants in sheep, Biomaterials, 1999, 20 : 1017-1022 ;

25

Balmain J., Hannoyer B., Lopez E., Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-Ray diffraction analyses of mineral and organic matrix during heating of mother of pearl (Nacre) from the shell of the mollusc *Pinctada maxima*, J. Biomed. Mater. Res. Applied Mat., 1999, 48 (5) : 749-754).

30

L'extraction lipidique peut être réalisée par tout procédé connu. Ainsi, par exemple

la poudre est mise en contact avec un solvant d'extraction lipidique tel qu'un mélange de chloroforme et de méthanol, ou de l'éthanol ou encore de l'hexane, le mélange est éventuellement agité pendant 1 à 6 heures, puis une séparation est réalisée, par exemple par centrifugation ou filtration, pour séparer la phase solide de la phase liquide, suivie avantageusement d'une élimination du solvant de la phase liquide, en particulier par évaporation, pour enfin récupérer les lipides désirées. Sont ainsi récupérés la quasi-totalité des lipides désirés. Selon un mode particulier, les lipides utilisés selon l'invention, notamment ainsi extraits, ne sont soumis à aucune modification chimique, notamment une saponification, pendant, 10 avant ou après leur extraction.

Lorsque le solvant d'extraction lipidique est le mélange chloroforme/méthanol ou l'hexane, la mise en contact, et éventuellement l'agitation, est avantageusement réalisée à température ambiante (entre environ 18°C et 25°C). Lorsque le solvant d'extraction lipidique est l'éthanol (l'éthanol absolu), la mise en contact, et éventuellement l'agitation, est avantageusement réalisée à une température comprise entre 30 et 40°C, et de préférence dans des rapports pondéraux poudre/solvant qui correspondent à 1/5. Les rapports pondéraux du mélange chloroforme/méthanol sont avantageusement de 2/1 et le rapport pondéral 15 poudre/solvant est de préférence 1/3. Lorsque le solvant d'extraction lipidique est l'hexane, le rapport pondéral poudre/solvant est de préférence de 1/3.

Lorsque les lipides sont séparés du solvant utilisé, ils se présentent généralement sous forme d'une pâte brune qui peut être directement utilisée dans la composition 25 pharmaceutique selon l'invention. D'autres séparations peuvent être réalisées par la suite à partir des lipides ainsi obtenus.

Ainsi, tout ou partie des lipides de la nacre, notamment obtenus selon le procédé décrit ci-dessus, peut être mis en œuvre selon la présente invention.

Les lipides ainsi obtenus correspondent en particulier à un mélange de composés polaires et apolaires. Ce mélange comprend généralement des céramides, du cholestérol, éventuellement du cholestérol sulfate et/ou acétate, des acides gras, des triglycérides et des lipides apolaires (plus apolaires que les précédents lipides cités), ceci est plus particulièrement le cas pour une huître, avantageusement une huître du genre *Pinctada* (généralement prise dans son biotope naturel). Bien entendu, la nature et la quantité de ces éléments peuvent varier dans une large mesure, notamment en fonction du mollusque, de son biotope, de la saison du prélèvement et des conditions du prélèvement.

10

Ainsi, pour donner un ordre de grandeur, une détermination des lipides extraits (extraction avec mélange de solvants chloroforme/méthanol - 2/1) de la nacre de *Pinctada margaritifera* a été effectuée sur couche mince après migration avec le solvant hexane/diéthyléther/acide acétique sur gel de silice et coloration au sulfate de cuivre. Les pourcentages exprimés en fonction de l'intensité de coloration des composés lipidiques sont les suivants :

Cholestérol sulfate: 0,5 %

Céramides Hydroxylés: 2,07%

Céramides Nonhydroxylés: 1,03%

20 Cholestérol: 5,97%

Acides Gras: 6,24%

Triglycérides: 4,46%

Cholestérol acétate: 0,7%

Lipides apolaires (plus apolaires que les lipides cités précédemment) : 79,03%

25 La présence d'omega parmi ces lipides a été détectée.

Comme le montrent plus en détail la partie expérimentale ci-après, les lipides ainsi obtenus présentent des propriétés très intéressantes. Ces propriétés incluent celles relatives aux effets sur la filaggrine et la transglutaminase membranaire 30 mentionnées auparavant. Les lipides extraits de nacre de mollusques naciers,

lorsqu'ils sont appliqués sur la peau, permettent également de restaurer la différenciation kératinocytaire avec réduction de l'hyperprolifération cellulaire. Ils présentent aussi l'avantage d'une innocuité totale et celui d'avoir un effet anti-inflammatoire.

5

Ainsi, la présente invention a pour objet une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend les lipides tels que définis ci-dessus et un excipient pharmaceutiquement acceptable.

10 L'administration de la composition selon l'invention peut être effectuée par voie topique, et éventuellement entérale ou parentérale. De préférence, la composition pharmaceutique est conditionnée sous une forme convenant à une application par voie topique.

15 Par voie entérale, la composition pharmaceutique, peut se présenter sous forme de comprimés, de gélules, de dragées, de sirops, de suspensions, de solutions, de poudres, de granulés, d'émulsions, de microsphères ou nanosphères ou vésicules lipidiques ou polymériques permettant une libération contrôlée. Par voie parentérale, la composition peut se présenter sous forme de solutions ou
20 suspensions pour perfusion ou pour injection.

Selon un mode particulier de l'invention, la composition pharmaceutique est destinée à un usage local sur la peau. Ainsi, le support pharmaceutiquement acceptable est en particulier un excipient approprié à une application topique.

25 Par voie topique, la composition pharmaceutique selon l'invention est plus particulièrement destinée au traitement des pathologies mentionnées ci-dessus, en particulier au traitement de la peau et des muqueuses. Elle peut se présenter sous forme d'onguents, de crèmes, de laits, de pommades, de poudres, de tampons imbibés, de solutions, de gels, de sprays, de lotions ou de suspensions. Elle peut
30 également se présenter sous forme de microsphères ou nanosphères ou vésicules

lipidiques ou polymériques ou de patches polymériques et d'hydrogels permettant une libération contrôlée. Cette composition par voie topique peut se présenter sous forme anhydre, sous forme aqueuse ou sous la forme d'une émulsion (émulsion eau/huile, huile/eau ou émulsion multiple).

5

Les lipides selon l'invention sont utilisés, de préférence par voie topique, à une concentration généralement comprise entre 0,02 % et 3 % en poids, de préférence entre 0,25 et 2 % en poids, et avantageusement entre 0,5 et 1 %, par rapport au poids total de la composition.

10

En particulier, la composition thérapeutique selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle contient, en association avec des excipients inertes, une quantité thérapeutiquement efficace de lipides extraits de nacre de mollusques nacriers tels que définis précédemment, notamment dans le traitement des pathologies 15 présentant une diminution de l'activité de la filaggrine et/ou une augmentation de l'activité de transglutaminase membranaire, plus spécifiquement pour traiter des pathologies liées à une diminution de l'activité cutanée de la filaggrine et/ou à une surexpression cutanée de la transglutaminase membranaire.

20

L'invention réside également dans une méthode de traitement de pathologies ou traumatismes liés à une diminution de l'activité de la filaggrine et/ou une augmentation de l'activité de transglutaminase membranaire de sujets atteints de tels pathologies ou traumatismes, comprenant l'administration à ces mammifères d'une quantité thérapeutiquement efficace de lipides extraits de nacre tel que définis 25 précédemment, en particulier pour traiter des pathologies liées à une diminution de l'activité cutanée de la filaggrine et/ou à une surexpression cutanée de la transglutaminase membranaire.

Plus spécifiquement, les pathologies liées à la diminution de l'activité cutanée de la 30 filaggrine et/ou à une surexpression cutanée de la transglutaminase membranaire

sont des pathologies cutanées, plus particulièrement choisies parmi le psoriasis, l'ichtyose et la dermatite atopique, et des maladies auto-immunes liées à une atteinte auto-immune de la filaggrine, telles que notamment la polyarthrite rhumatoïde.

5

Dans le contexte de l'invention, le terme « traitement » désigne le traitement préventif, curatif, palliatif, ainsi que la prise en charge des patients (réduction de la souffrance, amélioration de la qualité de vie, ralentissement de la progression de la maladie), etc.

10

Le traitement peut en outre être réalisé en combinaison avec d'autres ingrédients ou traitements, tels que notamment d'autres composés actifs pour traiter les pathologies ou traumatismes spécifiés dans la présente demande.

15

Les autres traitements peuvent être ceux mentionnés ci-dessus, incluant une variété de traitements par voie topique, par photothérapies et par voie orale. Les traitements topiques incluent notamment les stéroïdes, le goudron, l'anthraline, la vitamine D3 et analogues, les rétinoïdes, et les rayonnements UV. La photothérapie englobe le traitement suivi médicalement aux rayonnements ultraviolets de type B (UV-B) ou le traitement au psoralène en combinaison avec des UV-A. Les traitements par voie orale comprennent l'administration de methotrexate, rétinoïdes oraux ou de cyclosporine.

20

Les compositions pharmaceutiques ou médicaments selon l'invention peuvent comprendre en outre au moins un autre ingrédient thérapeutiquement actif, choisi notamment parmi ceux mentionnés ci-dessus, pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, notamment lors d'un traitement chez un sujet atteint d'une pathologie ou d'un traumatisme lié à une diminution de l'activité de la filaggrine et/ou une augmentation de l'activité de transglutaminase membranaire, tel que défini ci-dessus.

Les compositions pharmaceutiques ou médicaments selon l'invention comprennent avantageusement un ou plusieurs excipients ou véhicules inertes, c'est à dire pharmaceutiquement inactifs et non toxiques. On peut citer par exemple des 5 solutions salines, physiologiques, isotoniques, tamponnées, etc., compatibles avec un usage pharmaceutique et connues de l'homme du métier. Les compositions peuvent contenir un ou plusieurs agents ou véhicules choisis parmi les dispersants, solubilisants, stabilisants, conservateurs, etc. Des agents ou véhicules utilisables dans des formulations (liquides et/ou injectables et/ou solides) sont notamment la 10 méthylcellulose, l'hydroxyméthylcellulose, la carboxyméthylcellulose, les cyclodextrines, le polysorbate 80, le mannitol, la gélatine, le lactose, des huiles végétales ou animales, l'acacia, etc. Les compositions peuvent être formulées sous forme de suspension injectable, de gels, huiles, comprimés, suppositoires, poudres, gélules, capsules, etc., éventuellement au moyen de formes galéniques ou de 15 dispositifs assurant une libération prolongée et/ou retardée. Pour ce type de formulation, on utilise avantageusement un agent tel que la cellulose, des carbonates ou des amidons.

Les compositions telles que décrites précédemment peuvent bien entendu en outre 20 contenir des additifs pharmacodynamiquement actifs ou une combinaison de ces additifs, et notamment : des agents mouillants ; des émollients; des agents hydratants, comme le glycérol, le PEG 400, ou bien encore l'urée ; d'autres agents anti-psoriatiques tels que notamment les stéroïdes, le goudron, l'anthraline, la vitamine D3 et analogues, et les rétinoïdes.

25

Ces compositions peuvent également contenir des agents d'amélioration de la saveur, des agents conservateurs tels que les esters de l'acide parahydroxybenzoïque, les agents stabilisants, des agents régulateurs d'humidité, des agents régulateurs de pH, des agents modificateurs de pression osmotique, 30 des agents émulsionnants, des filtres UV-A et UV-B, des antioxydants, tels que l'α-

tocophérol, le butylhydroxyanisole ou le butylhydroxytoluène.

Bien entendu, l'homme du métier veillera à choisir le ou les éventuels composés à ajouter à ces compositions de telle manière que les propriétés avantageuses attachées intrinsèquement à la présente invention ne soient pas ou 5 substantiellement pas altérées par l'addition envisagée.

- L'administration peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier, notamment par voie orale, topique ou par injection, typiquement par voie intraperitoneale, intra-cérébrale, intra-thécale, intra-veineuse, intra-artérielle ou intramusculaire. L'administration par voie topique ou orale est préférée. S'agissant d'un traitement à long terme et non topique, la voie d'administration préférée sera sublinguale, orale ou transcutanée.
- 10
- 15 Pour les injections, les composés sont généralement conditionnés sous forme de suspensions liquides, qui peuvent être injectées au moyen de seringues ou de perfusions, par exemple. Il est entendu que le débit et/ou la dose injectée, ou de manière générale la dose à administrer, peuvent être adaptés par l'homme du métier en fonction du patient, de la pathologie, du mode d'administration, etc.. Il est 20 entendu que des administrations répétées peuvent être réalisées, éventuellement en combinaison avec d'autres ingrédients actifs ou tout véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique (tampons, solutions saline, isotonique, en présence d'agents stabilisants, etc.).
- 25 Selon un aspect particulier, l'invention concerne un dispositif, en particulier adapté à une injection sous-cutanée ou percutanée, comprenant les lipides tels que définis ci-dessus et un excipient physiologiquement acceptable, qui est en particulier adapté à une injection sous-cutanée ou percutanée. Ce dispositif peut notamment être sous forme de seringues ou de perfusions.

L'invention est utilisable chez les mammifères, en particulier chez l'être humain.

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

5

EXEMPLES

Cette partie démontre l'efficacité des lipides tels que définis ci-dessus.

10 **1- Préparation des lipides extraits de nacre**

Extraction du culot par un mélange Chloroforme / méthanol :

60 g de la poudre obtenue à partir de nacre d'huîtres *Pinctada margaritifera* est mélangée avec 120ml du mélange chloroforme/méthanol (rapport pondéral : 2/1).

15 On agite à température ambiante pendant environ 4 heures. On filtre, puis on évapore pour récupérer la partie lipidique.

Les lipides obtenus sont incorporés dans une base de crème appelée ci-dessous excipient pour donner les Formulations P1 et P2 signalées ci-dessous.

20

2-Préparation des explants et délipidation :

Sur une plastie cutanée, il a été appliqué un mélange éther/acétone sur une zone définie. Dans cette zone, ainsi délipidée, 15 explants ont été prélevés. 6 autres explants ont été prélevés dans une zone non délipidée.

Répartition des 15 explants délipidés en 5 lots :

- D (Peau Délipidée Témoin, 6 explants)
- 30 - DE (Peau Délipidée + Excipient, 3 explants)
- DP1 (Peau Délipidée + Produit 1, 3 explants)
- DP2 (Peau Délipidée + Produit 2, 3 explants)

Répartition des 6 explants non délipidés en deux lots No (Peau Normale à T0) et N3 (Peau Normale à T 3 heures).

3-Produits testés :

5

Les produits testés sont :

10

- Formulation de base : Excipient,
- Formulation P1 à 0,5 % en poids de lipides
- Formulation P2 à 1,0 % en poids de lipides

4-Application des produits :

15

Les produits à tester ont été appliqués sur les explants dès la réalisation de ceux-ci. Ils ont été appliqués en topique (4 mg / explant) durant 3 heures sur les lots DE, DP1 et DP2 ; les lots No, N3 et D ne reçoivent aucun traitement.

5-Histologie :

20

Au temps T0, dès la fin de la délipidation, 3 explants des lots No et Do sont prélevés et fixés pour moitié dans du Bouin ordinaire, et pour autre moitié congelés. Au temps 3 heures après le début du traitement, les 3 explants de chaque lot (N3, D3, DE, DP1 et DP2) sont prélevés et fixés de la même manière.

25

L'étude histologique consiste en :

- L'analyse histologique du stratum corneum par la coloration au trichrome de Masson.
- Le marquage de la filaggrine par l'anti-corps monoclonal anti-filaggrine (réf BT 576 de BTI Cliniscience) Clone OKTB1 révélé en immunofluorescence avec un système amplificateur biotine/streptavidine et les noyaux contre-colorés à l'iodure de propidium.
- Le marquage de la transglutaminase membranaire par l'anti-corps monoclonal anti-TGM (Harbor Products TEBU réf 5003) clone B.C1 révélé en immunofluorescence avec un système amplificateur biotine/streptavidine et

les noyaux contre-colorés à l'iodure de propidium.

6-RESULTATS :

5

Observation morphologique du stratum corneum après coloration au trichrome de Masson :

Peau non délipidée à TO (No) :

10 Le stratum corneum est assez compact, peu feuilletté, kératinisé en surface et à la base.

Peau délipidée à To (Do) :

Le stratum corneum est plus compact et plus kératinisé en surface et à sa base.

15

Peau normale à 3H (N3) :

Le stratum corneum est plus ou moins compact, peu kératinisé en surface et en basal.

20 **Peau délipidée à 3 h (D3) :**

Le stratum corneum est compact, nettement kératinisé en surface et en basal.

Peau délipidée + excipient (DE) :

Le stratum corneum est assez feuilletté et légèrement kératinisé.

25

Peau délipidée + formulation à 0,5 % des lipides (DP1) :

Le stratum corneum est légèrement feuilletté, légèrement kératinisé en surface est nettement en basal.

30 **Peau délipidée + formulation à 1,0 % des lipides (DP2) :**

Le stratum corneum est plus ou moins feuilletté, légèrement kératinisé en surface et plus nettement en basal. Proche de P1.

Immunomarquage de la filaggrine :

5

Peau non délipidée à T0 (N0) :

Le marquage est fort et très irrégulier. Il est observé sur 6 à 7 assises cellulaires et nettement sur-exprimé par rapport à la normale.

10 **Peau délipidée à T0 (D0) :**

Le marquage est proche de celui observé sur la peau non délipidée à T0, mais présent sur un nombre plus réduit d'assises cellulaires avec un léger marquage dans les structures épidermiques, marquage qui est parfois observé sur les peaux très sèches.

15

Peau normale à T 3h (N3) :

Le marquage est fort et très irrégulier. Il est observé sur 3 à 7 assises cellulaires et nettement sur-exprimé par rapport à la normale.

Le marquage est identique à celui observé sur la peau non délipidée à T0.

20

Peau délipidée à T3h (D3) :

Le marquage présent est variable, généralement observé sur un nombre plus réduit d'assises cellulaires, et beaucoup moins fort et très irrégulier.

25 **Peau délipidée + Excipient (DE) :**

Le marquage est présent sur 4 à 5 assises cellulaires. Il est irrégulier et légèrement supérieur à celui observé sur la peau délipidée à T3h.

Peau délipidée + formulation à 0,5 % des lipides (DP1) à 3h :

30 Le marquage est fort et plus ou moins régulier. Il est observé sur 6 à 7 assises

cellulaires et nettement sur-exprimé par rapport à la normale.

Le marquage est proche de celui observé sur la peau non délipidée à T3h.

Peau délipidée + formulation à 1,0 % des lipides (DP2) :

- 5 Le marquage est proche de celui observé avec P1 et présent sur un nombre identique d'assises cellulaires.

Marquage de la transglutaminase membranaire :

10 **Peau non délipidée à T0 (N0) :**

Le marquage est très fin, assez faible et irrégulier sur 2 à 3 assises cellulaires.

Peau délipidée à T0 (Do) :

Le marquage est très fin, plus ou moins faible et irrégulier sur 2 à 3 assises

- 15 cellulaires. Il est proche de celui de la peau normale à T0.

Peau normale à T 3h (N3) :

Le marquage est fin, assez net et assez régulier sur 2 à 3 assises cellulaires. Il est proche de celui de la peau normale à T0.

20

Peau délipidée à T 3h (D3) :

Le marquage est très faible sur 1 assise cellulaire et souvent absent du stratum corneum.

25 **Peau délipidés + Excipient (DE) :**

Le marquage est assez net et plus ou moins régulier sur 2 à 3 assises cellulaires.

Peau délipidée + formulation à 0,5 % des lipides (DP1) :

Le marquage est faible, plus ou moins régulier et observé sur 2 à 3 assises

- 30 cellulaires.

Peau délipidée + formulation à 1,0 % des lipides (DP2) :

Le marquage est pratiquement absent du stratum corneum.

5

MORPHOLOGIE GENERALE DU STATUM CORNEUM

A T0, sur la peau non délipidée, le stratum corneum est assez compact et kératinisé en surface et à la base. Il est plus compact et kératinisé sur la peau délipidée. Cet aspect montre une structure de peau sèche.

A T 3h, sur la peau normale, il montre une structure relativement feuilletté. Il reste assez compact sur la peau délipidée. Sur la peau délipidée traitée avec la formulation P1, il est légèrement moins compact et plus ou moins feuilletté. Sur celle traitée avec la formulation P2, il est observé des aspects proches de ceux observés avec la formulation P1.

20 **EXPRESSION DE LA FILAGGRINE :**

A T0, sur la peau normale et délipidée, la filaggrine est fortement sur-exprimée, présente sur 6 à 7 assises cellulaires sur tout le stratum corneum.

25 A T3h, sur la peau délipidée, la filaggrine est moins forte, très irrégulière et présente sur un nombre très variable d'assises cellulaires. Sur la peau normale, elle est identique à celle de la peau à T0.

30 Avec l'excipient, l'expression de filaggrine est légèrement supérieure à celle observée sur la peau délipidée sans produit à 3h.

La formulation P1, à 0,5 % de lipides de nacre, induit une sur-expression de la filaggrine, qui se trouve présente sur 6 à 7 assises cellulaires et est d'une intensité supérieure à celle observée sur la peau normale à T3h.

5

La formulation P2, à 1 % de lipides de nacre, induit une très nette sur-expression de la filaggrine. Elle est très légèrement supérieure à celle observée avec la formule P1.

10 **EXPRESSION DE LA TRANSGLUTAMINASE MEMBRANAIRE :**

A T0, sur la peau normale et délipidée, la transglutaminase membranaire est très faible, très irrégulière et présente sur 2 à 3 assises cellulaires.

15 A T 3h, sur la peau délipidée, la transglutaminase membranaire (TGM) est très faible et présente sur une à deux assises cellulaires. Sur la peau normale, elle est légèrement supérieure à celle de la peau à T0. Avec l'excipient, l'expression de TGM apparaît plus marqué que la peau normale et délipidée sans traitement.

20 La formulation P1, à 0,5 % de lipides de nacre, induit une très faible expression de TGM nettement inférieure à celle observée sur la peau délipidée à T3h et traitée avec l'excipient.

25 La formulation P2, à 1 % de lipides de nacre, n'induit pratiquement pas d'expression de TGM.

CONCLUSION

30 La protéolyse de la filaggrine produit, entre autres, de très nombreux acides aminés

qui rentrent dans la composition des NMF (Facteur Naturel d'Hydratation). Ces NMF se trouvent localisés entre les cornéocytes du stratum corneum.

L'hyper-expression de filaggrine montre le caractère de peau sèche de la plastie utilisée. Ce caractère a été amplifié par la délipidation.

- 5 Les formulations P1 et P2 induisent, sur la peau délipidée, une expression de la filaggrine proche de celle d'une peau normale. Elles ont apporté au stratum corneum les éléments nécessaires à la rapide reconstitution du ciment intercellulaire.
- 10 Les deux formulations P1 et P2 sont actives dans la reconstitution du ciment intercellulaire, avec un léger avantage à la formulation P2 à 1% de lipides de nacre.

La composition des enveloppes cornées est régulée par la transglutaminase membranaire. La faible expression de la TGM, observée à T0 est un signe d'un caractère de peau sèche. Il est amplifié par la délipidation de la plastie avec le mélange de solvants, augmentant ainsi l'altération de ces enveloppes. La peau a donc puisé dans ses éléments recomposant la structure des enveloppes cornées : la TGM.

Les deux formulations, P1 et P2 semblent inhiber l'expression de la TGM avec un effet dose. Ces produits semblent empêcher le retour à un niveau normal de la TGM.

Les deux formulations P1 et P2 inhibent l'expression de la transglutaminase membranaire.

REVENDICATIONS

5

1. Composition pharmaceutique comprenant des lipides extraits de nacre de mollusques nacriers dans un support pharmaceutiquement acceptable.

10 2. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée en ce que les

mollusques nacriers sont des huîtres.

15 3. Composition pharmaceutique selon la revendication 2, caractérisée en ce que les huîtres sont des huîtres du genre *Pinctada* et plus particulièrement du genre *Pinctada* espèce *margaritifera*.

15

4. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le support pharmaceutiquement acceptable est un excipient approprié à une application topique, entérale ou parentérale.

20

5. Composition selon la revendication précédente, caractérisée en ce que le support pharmaceutiquement acceptable est un excipient approprié à une application topique.

25 6. Composition selon la revendication précédente, caractérisée en ce que les lipides sont présents à une concentration comprise entre 0,02 % et 3 % en poids, de préférence entre 0,25 et 2 % en poids, et avantageusement entre 0,5 et 1 %, par rapport au poids total de la composition.

30 7. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes,

caractérisée en ce qu'elle est destinée à traiter des pathologies présentant une

diminution de l'activité de la filaggrine et/ou une augmentation de l'activité de transglutaminase membranaire.

8. Composition selon la revendication précédente, caractérisée en ce qu'elle est
5 destinée à traiter des pathologies liées à une diminution de l'activité cutanée de la filaggrine et/ou à une surexpression cutanée de la transglutaminase membranaire.

9. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes,
caractérisée en ce qu'elle est destinée à traiter des pathologies cutanées, plus
10 particulièrement choisies parmi le psoriasis, l'ichtyose et la dermatite atopique.

10. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 8,
caractérisée en ce qu'elle est destinée à traiter des maladies auto-immunes liées à
une atteinte auto-immune de la filaggrine, en particulier la polyarthrite rhumatoïde.

15 11. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 10,
caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un autre ingrédient
thérapeutiquement actif pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le
temps.

20 12. Composition selon la revendication précédente, caractérisée en ce que l'autre
ingrédient thérapeutiquement actif est choisi parmi les stéroïdes, le goudron,
l'anthraline, la vitamine D3 et analogues, et les rétinoïdes.

25 13. Lipides extraits de nacre de mollusques nacriers tels que définis selon l'une des
revendications 1 à 3, à titre de médicament.

14. Dispositif comprenant des lipides tels que définis dans l'une des revendications
1 à 3 et un excipient physiologiquement acceptable.

15. Dispositif selon la revendication précédente, caractérisé en ce que sa forme est adaptée à une injection sous-cutanée ou percutanée, en particulier sous forme de seringue ou de perfusion.